

红花檵木 *R2R3-MYB* 基因 *LcMYB113* 调控花青苷合成

卢 芃¹, 荣朵艳¹, 廖晓珊², 肖杨瑶¹, 张邦跃^{1*}

(1. 湖南工业大学 生命科学与化学学院/百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心, 湖南 株洲 412007; 2. 株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲 412007)

摘 要: 花青苷物质是影响红花檵木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 观赏价值形成的关键因素之一。为探究红花檵木花青苷合成的分子机制, 该研究从红花檵木中克隆了 1 个花青苷合成相关的 *R2R3-MYB* 基因, 命名为 *LcMYB113* (GenBank 序列号: OR344758), 并初步分析了其生物信息学、红花檵木和白花檵木叶片中的 *LcMYB113* 的表达水平、转基因烟草株系的表型及花青苷合成结构基因的表达。结果表明: (1) *LcMYB113* 基因开放阅读框全长为 789 bp, 编码 262 个氨基酸, 其 N 端含有 R2R3 DNA 结合域和 bHLH 转录因子的结合基序[D/E]₂[R/K]₃L₆L₃R, 同时还具有花青苷正调控相关的 2 个特征基序 ANDV 和[K/R]₂P[Q/R]₂P[Q/R]。系统进化树分析表明, *LcMYB113* 与牡丹的 PsMYB58、葡萄的 VvMYBA1 等多种植物的花青苷特异调控 R2R3-MYB 转录因子的亲缘关系较近。(2) 红花檵木叶片中的花青苷含量为白花檵木中的 7.4 倍, *LcMYB113* 基因在红花檵木叶片中的相对表达量为白花檵木的 101 倍, 表明 *LcMYB113* 基因的表达与花青苷含量趋势相一致。(3) 通过构建基因过表达载体并转化烟草, 烟草中过表达 *LcMYB113* 基因能够诱导转基因株系叶片和花朵中花青苷物质的积累, 同时 *NtANS*、*NtDFR*、*NtCHS* 等多个花青苷生物合成结构基因在叶片中的相对表达量相比于野生型株系显著增加。以上研究结果表明 *LcMYB113* 能够调控花青苷物质的合成, 为红花檵木的叶色育种提供理论支持。

关键词: 红花檵木, 花青苷, *LcMYB113*, 基因克隆, 实时荧光定量 RT-PCR

中图分类号: Q941 文献标志码: A 文章编号:

Function of *R2R3-MYB* Gene *LcMYB113* on regulating anthocyanin biosynthesis in *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

LU Peng¹, RONG Duoyan¹, LIAO Xiaoshan², XIAO Yangyao¹, ZHANG Bangyue^{1*}

(1. Provincial Engineering Research Center of Lily Germplasm Resource Innovation and Deep Processing, College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007, Hunan, China; 2. Zhuzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhuzhou 412007, Hunan, China)

Abstract: Anthocyanin plays one of the key factors in determining ornamental value of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*. In order to investigate the molecular mechanisms of anthocyanin biosynthesis in *L. chinense* var. *rubrum*, an anthocyanin biosynthesis relative R2R3-MYB gene, named *LcMYB113* with GenBank accession number OR344758, was cloned from *L. chinense* var. *rubrum*. The deduced amino acid sequence of *LcMYB113* gene was analyzed by bioinformatics methods. The relative expression levels of *LcMYB113* gene in leaves of *L. chinense* var. *rubrum* and *L. chinense* were tested by real-time

基金项目: 国家自然科学基金 (32100576); 湖南省自然科学基金 (2024JJ4018, 2024JJ7156); 湖南省教育厅基金 (23B0541)。

第一作者: 卢芃 (1998—), 硕士研究生, 研究方向为植物分子育种, (E-mail) lupeng2ttt@163.com。

***通信作者:** 张邦跃, 博士, 讲师, 研究方向为观赏植物分子育种, (E-mail) cauzhang@163.com。

quantitative RT-PCR method. The phenotypes of leaves and flowers of transgenic tobacco lines were recorded. The relative expression levels of anthocyanin biosynthetic structural genes in leaves of transgenic tobacco lines were examined. The results were as follows: (1) The open reading frame of *LcMYB113* gene was 789 bp, encoding 262 amino acids. Multiple alignment analysis showed that the N-terminal of *LcMYB113* contained a canonical R2R3 DNA binding domain and a bHLH transcript factor binding motif [D/E]_{LX2}[R/K]_{X3}LX₆LX₃R. Two anthocyanin biosynthesis activator characteristic motifs ANDV and [K/R]P[Q/R]P[Q/R] were also found in the amino acid sequence of *LcMYB113*. Phylogenetic tree analysis indicated that *LcMYB113* was closely related to anthocyanin specific R2R3-MYB subfamily transcription factors, including PsMYB58 of *Paeonia suffruticosa* and VvMYBA1 of *Vitis vinifera*. (2) The anthocyanin content and relative expression level of *LcMYB113* gene in leaves of *L. chinense* var. *rubrum* were 7.4 and 101 times that of *L. chinense* respectively, which indicated that the relative expression levels of *LcMYB113* gene was correlated with the anthocyanin content in leaves. (3) The *LcMYB113* gene overexpression vector was constructed and transformed into tobacco variety WS38. Heterologous expression of *LcMYB113* gene in tobacco induced anthocyanin accumulation in leaves and flowers of transgenic lines. Further more, compared with wide type tobacco line, transgenic lines had remarkably higher relative expression levels of anthocyanin biosynthetic structural genes, such as *NtANS*, *NtDFR* and *NtCHS*. In summary, this research results indicate that *LcMYB113* can regulate the biosynthesis of anthocyanin, providing theoretical support for leaf color breeding of *L. chinense* var. *rubrum*.

Keywords: *Loropetalum chinense* var. *rubrum*, anthocyanin, *LcMYB113*, gene cloning, real-time quantitative RT-PCR

红花檵木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 为金缕梅科檵木属的多年生植物, 树姿挺拔, 枝条红褐色, 花红叶艳, 观赏性极佳, 是原产于我国的特色观花观叶植物 (董淑龙等, 2022)。此外, 红花檵木适应性强、耐修剪、易于塑形, 在长江流域及南方地区常常作为主要的彩叶观赏植物大量应用于城市道路、公园、社区等绿化中 (张艺帆等, 2022)。

红花檵木作为我国特色的观花观叶园林绿化植物 (彭润珉和于晓英, 2012; Zhang et al., 2023), 其花青苷物质类型及含量的差异是造成红花檵木不同品种间叶色差异的基础, 在红花檵木的叶片中已经检测到 15 种花青苷物质, 其中包括天竺葵素、矢车菊素、锦葵素等 (陈倩如等, 2021)。已有研究表明, 花青苷物质的生物合成依赖于多种结构酶类的活性, 包括苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL)、查尔酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶 (Chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮 3-羟化酶 (Flavanone 3-hydroxylase, F3H)、黄烷酮 3'-羟化酶 (Flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)、二氢黄酮醇 4-还原酶 (Dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合成酶 (Anthocyanidin synthase, ANS) 等 (Li et al., 2014; Chaves-silva et al., 2018; Khusnutdinov et al., 2021)。在植物中, R2R3-MYB 类转录因子被认为是调控花青苷生物合成结构基因表达的关键转录因子, R2R3-MYB 能够结合花青苷生物合成结构基因的启动子区域并激活靶基因的表达, 从而促进花青苷物质的积累; 此外, R2R3-MYB 还能与 bHLH 及 WD40 形成转录复合体共同调控花青苷物质的合成 (Feller et al., 2011; Li et al., 2014; An et al., 2020; Yan et al., 2021)。研究表明, R2R3-MYBs 蛋白的 N 端 R2R3 DNA 结构域相对保守, 而 C 端具有多样性 (Wu et al., 2022)。基于拟南芥 R2R3-MYB 蛋白 AtWER 的晶体结构分析, 证明 R2R3 结构域形成两组各 3 个 α 螺旋的结构, 该结构域特异识别 DNA 序列 5'-AACNGC-3' (Wang et al., 2020), 而 R3 结构中的 RB 基序是识别 bHLH 的特征序列 (Zimmermann et al., 2004; Wang et al., 2022a)。在观赏植物中, 已经陆续克隆并鉴定了多个调控花青苷合成的 R2R3-MYB 转录因子, 包括菊花 (*Chrysanthemum × morifolium*) (Wang et al., 2022b)、牡丹 (*Paeonia*) (Liu et al., 2022; Shi et al., 2022)、百合 (*Lilium*) (Yin et al., 2021) 和贴梗海棠 (*Chaenomeles speciosa*) (Ren et al., 2023) 等, 这些 R2R3-MYB 转录因子在花青苷生物合成中起重要的调控作用。例如: 菊花的 CmMYB9a 正调控花瓣中花青苷物质的合成, 该转录因子能够结合并转录激活花青苷

生物合成结构基因 *CmCHS* 和 *CmDFR* 的启动子活性, 在菊花中瞬时过表达或烟草中稳定过表达 *CmMYB9a* 基因都能诱导花青苷物质的积累 (Wang et al., 2022b)。卵叶牡丹 (*Paeonia qiui*) 的 *PqMYB113* 能够转录激活靶基因 *PqDFR* 和 *PqANS* 的活性, 从而促进叶片中花青苷物质的合成, 在烟草和拟南芥中异源表达 *PqMYB113* 基因也能够促进花青苷生物合成结构基因的表达及产物的积累 (Liu et al., 2022)。紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*) 的 *PrMYB5* 能转录激活 *PrDFR* 基因的表达并正调控花瓣中花青苷物质的合成 (Shi et al., 2022), 这与卵叶牡丹 *PqMYB113* 的功能类似。*LvMYB5* 是东方百合栽培品种 ‘Vivian’ (*Lilium oriental hybrids cultivar Vivian*) 花瓣中花青苷物质合成的正调控因子, 抑制该基因的表达会导致百合花瓣中花青苷积累减少, 而烟草叶片中瞬时表达该基因会促进花青苷色素的积累 (Yin et al., 2021)。此外, 贴梗海棠 (*Chaenomeles speciosa*) (Ren et al., 2023)、鸡爪枫 (*Acer palmatum*) (Sun et al., 2022)、斜纹粗肋草 (*Aglaonema commutatum*) (Li et al., 2022) 和月季 (*Rosa hybrida*) (李茂福等, 2022) 等观赏植物的 R2R3-MYBs 因子也被发现能够正调控花青苷物质的合成。目前, 除了在红花檵木中克隆了多个花青苷生物合成途径的结构基因外 (张翔, 2020; 李彩虹, 2021), 对其生物合成调控的相关分子机制还不清楚, 也没有关键调控转录因子 R2R3-MYB 功能的报道。

本研究基于转录组测序数据克隆了红花檵木的一个 R2R3-MYB 家族基因 *LcMYB113*, 对其进行生物信息学分析, 构建过表达载体及遗传转化烟草, 对比分析转基因和野生型烟草在表型、花青苷含量、花青苷合成结构基因的表达量之间的差异, 拟探讨以下问题: (1) *LcMYB113* 蛋白理化性质、结构、所属家族及物种间的进化关系; (2) *LcMYB113* 基因在红花檵木和白花檵木叶片中的表达情况; (3) 通过 *LcMYB113* 基因在烟草中异源表达分析其是否能够诱导花青苷生物合成。通过对 *LcMYB113* 基因的克隆及功能研究, 本研究确定 *LcMYB113* 基因编码蛋白归属于正调控花青苷合成的 R2R3-MYB 因子, 该基因的表达能够促进植物中花青苷合成结构基因的表达及花青苷物质的积累, 这为进一步开展红花檵木叶色育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

红花檵木植株为 6~8 年扦插苗, 白花檵木植株为 6~8 年实生苗, 野生型烟草 (*Nicotiana tabacum*) 株系 (Wisconsin-38, WS38) 及转基因烟草株系盆栽于湖南工业大学百合工程研究中心植物生长室, 生长条件为 22 °C 恒温, 光照周期为 16 h 光照、8 h 黑暗。新鲜的叶片用于直接提取花青苷物质, 部分新鲜叶片经液氮速冻后放置于 -80 °C 冰箱, 用于进一步的 RNA 提取、cDNA 第一链合成及实时荧光定量 RT-PCR 分析。

野生型及转基因烟草种子在培养基生长 2 周后, 移植到营养土中再继续生长约 18 周后, 植株主花序正常开花, 采集主花序向下的第 5 或 6 片叶片。一部分新鲜的叶片材料用于直接提取花青苷物质, 另一部分经液氮速冻后放置于 -80 °C 冰箱, 用于进一步的基因表达分析。

1.2 *LcMYB113* 克隆与遗传转化烟草

使用通用植物 RNA 快速提取试剂盒 RN52 (北京艾德莱生物科技有限公司) 提取红花檵木的总 RNA。使用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 合成 cDNA 的第一链。利用高保真酶 GXL [宝日医生物技术 (北京) 有限公司] 扩增红花檵木 *LcMYB113* (GenBank 序列号 OR344758) 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列, 基因特异引物见表 1, 扩增体系为 50 μ L。PCR 体系配置为: 5 \times GXL Buffer 10.0 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 4.0 μ L, 正、反向引物各 1.0 μ L, 第一链 cDNA 模板 0.5 μ L, GXL 高保真酶 1.0 μ L, ddH₂O 补充至 50 μ L。PCR 扩增程序为: 预变性 95 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 68 °C 1 min, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 10 °C 保存。*LcMYB113* ORF 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及回收后, 利用 ClonExpress II One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 无缝连接到 pSuper1300 过表达载体中 (荣朵艳等, 2019)。重组过表达载体 pSuper-*LcMYB113* 通过热激法转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 单菌落测序正确后, 提取阳性菌的质粒, 并利用液氮冻融法将质粒转化到农杆菌感受态 EHA105 中。

利用农杆菌介导的叶盘法将 *LcMYB113* 基因转化到烟草 WS38 中 (Gallois & Marinho, 1995)。转基因烟草材料在含 20 mg·L⁻¹ 的潮霉素和 200 mg·L⁻¹ 的特美汀抗性培养基中分化及生根, 再移栽到营养土中盆栽生长。利用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 提取转基因烟草 T0 代植株叶片的基因组 DNA, 利用潮霉素抗性基因 (*Hygromycin phosphotransferase*, *HYG*)、*LcMYB113* 基因的鉴定引物 (见表 1, 转基因鉴定引物) 进行 PCR 鉴定并获得阳性苗, 继续养护至开花、收获种子。选取 3 个具有代表性表型的转基因株系 T0 代种子, 经过含潮霉素培养基筛选后, 将 T1 代转基因阳性幼苗移植于营养土中继续生长, 直至主花序正常开花, 用于进一步的取样分析。代表性转基因植株的叶片在早期生长阶段局部出现斑点状的色素积累, 随着生长时间的增加, 色素斑点不断增加并连成片, 最终叶片大部分面积表现为紫红色。利用转基因鉴定引物对 3 个选定的转基因株系中 *LcMYB113* 基因的表达进行半定量 RT-PCR 检测, 内参基因选择 *NtActin* (GenBank 序列号: LOC107831145)。

引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

表 1 基因克隆、表达分析引物序列

Table 1 Primers for the gene cloning and gene expression analysis

注释 Annotation	基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
基因克隆 Gene clone	<i>LcMYB113</i>	F: CCAAATCGACTCTAGAATGATCCGAATGTACACCAA; R: TCGACCCCGGGCCCTGCAGTCACGCAITTAAGAATCCCCA
转基因鉴定 Transgenic identification	<i>NtActin</i>	F: AGGCTGTCCTTTCCTTGATG; R: GACTCATCGTACTACCCCTTIG
	<i>LcMYB113</i>	F: TGGTATCGCATTCACCTCA; R: TCCAGCCGCTCTGTAGGTT
	<i>HYG</i>	F: TACACAGCCATCGGTCCAGA; R: CGCAAGGAATCGGTCAATACAC
实时定量 RT-PCR Real-time quantitative RT-PCR	<i>LcMYB113</i>	F: ATCTCCATAGTCTCCACTCTCC; R: AATCGCCAAATCGCCAAATC
	<i>LcGADPH</i>	F: TTGGCATCGTTGAGGGTCT; R: CAGTGGGAACACGGAAGC
	<i>NtCHS</i>	F: TGACACCCACTTGGATAGTTAG; R: CGACCTCTGGAATTGGATCAG
	<i>NtF3H</i>	F: CCGACCTTACCCTTGGACTG; R: TCGAGTTCACCACTGCTTGA
	<i>NtF3'H</i>	F: AGGCTCAACACTTCTCGT; R: CATCAACTTTGGGCTTCT
	<i>NtDFR</i>	F: AACCAACAGTCAGGGGAATG; R: TTGGACATCGACAGTTCAG
	<i>NtANS</i>	F: TGGCGTGAAGCTCATACTG; R: GGAATTAGGCACACACTTTCG
	<i>NtActin</i>	F: ATGAGTTCGCTGTGCTCCT; R: TACCTGTTGTACGGCCACTG

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN6.0 软件对 *LcMYB113* 基因进行序列分析, 利用 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源蛋白搜索, 并利用 Mega5 软件及邻接法进行系统进化树的构建, 并进行了 1 000 次重复的 bootstrap 测试。运用在线网站 Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对蛋白的保守结构域进行预测。运用在线网站 Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白的理化性质进行预测。利用在线网站 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对蛋白质的三级结构进行预测。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

检测红花檵木 *LcMYB113* 基因相对表达量的实时荧光定量 RT-PCR 引物见表 1, 内参基因选择甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*) (张力等, 2013)。同时订购烟草花青苷生物合成结构基因 (包括 *NtANS*、*NtDFR*、*NtCHS* 等) 及内参基因 *NtActin* 的实时荧光定量 RT-PCR 引物 (Liu et al., 2022)。利用 FastStart Essential DNA Green Master (罗氏生命科学公司) 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒检测基因在组织中的相对表达情况。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL: 2 × Green Master 混合液 10.0 μL, 正向、反向引物各 1.0 μL, 稀释后的 cDNA 模板 5.0 μL, 去离子水补足至 20.0 μL。扩增程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 共 40 个循环。每个反应设 3 次重复。利用 Excel 2010 软件和 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达量, 用 GraphPad.Prism.9.5 软件进行柱形图的绘制。其中, 进行红花檵木叶片中基因相对表达量分析时, 以白花檵木叶片中对应基因的表达量为单位 1 进行计算; 进行转基因烟草叶片中相关基因的相对表达量分析时, 以野生型烟草叶片中对应基因的表达量为单位 1 进行计算; 利用 SPSS20 软件及 T 检验以确定基因表达量的差异性。不同的材料分别选取 3 个独立植株的叶片提取 RNA 及进行后续实时定量分析, 以通过 3 次生物学重复确定数据的可靠性。

1.5 花青苷含量测定

红花檵木和白花檵木的叶片、烟草叶片的花青苷提取及含量测定用盐酸乙醇方法 (李长江, 2018) 进行。具体操作如下: 剪取相应组织新鲜材料叶片, 在分析天平上进行称重约 20 mg; 将样品放入石英研钵中, 同时加入 4 mL 的提

取液 (0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸乙醇溶液) 进行充分研磨, 将研磨后的溶液转至 15 mL 离心管中, 将离心管在 95 °C 水浴锅中加热 5 min, 在 28 °C 的黑暗条件下过夜孵育; 室温离心机 1 000 g 离心 1 min, 取出上清液, 用紫外分光光度计测定 OD 值 (OD530 与 OD650); 根据 [(OD530-0.25 * OD650)*V(mL)]/m(g) 公式计算样品中的花青苷含量, 单位为 μg·g⁻¹ FW。共进行 3 个独立株系的叶片中花青苷物质的测定, 并用于进一步数据分析, 用 GraphPad.Prism.9.5 软件进行柱形图的绘制, 利用 SPSS20 软件及 Duncan 氏方法进行不同材料之间花青苷含量的显著差异性分析。

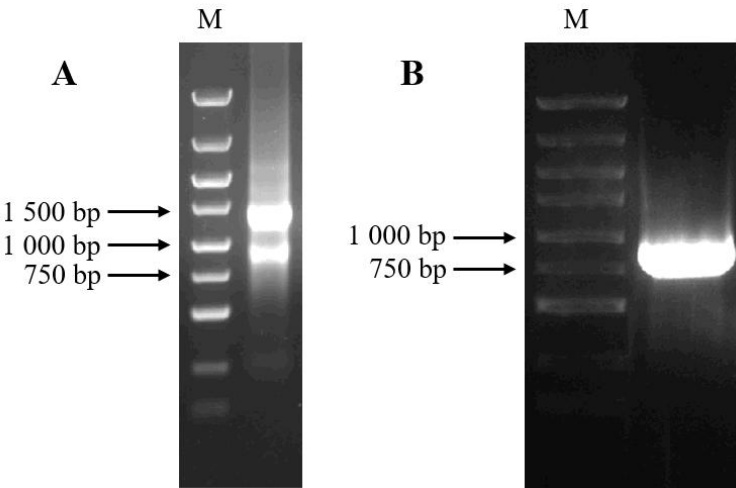
2 结果与分析

2.1 *LcMYB113* 基因克隆及生物信息学分析

基于转录组测序结果, 设计基因扩增特异引物, 以红花檵木叶片的 cDNA 为模板 PCR 扩增 *LcMYB113* 基因的 ORF 序列(图 1 所示)。测序结果表明,*LcMYB113* 的 ORF 为 789 bp, 编码 262 个氨基酸。利用 ProtParam 在线分析 *LcMYB113* 蛋白的理化性质, 预测出该蛋白分子量为 30 125.55 kDa, 分子式为 C₁₃₂₆H₂₁₂₅N₃₈₉O₃₈₉S₁₂, 亮氨酸 (Leucine, Leu) 含量最高 (占 11.1%), 组氨酸 (Histidine, His) 含量最低 (占 1.5%), 等电点为 9.2, 呈碱性, 不稳定系数为 39.3, 疏水性为 -0.578, 是负值, 表明 *LcMYB113* 蛋白是碱性且不稳定的疏水蛋白。利用 SWISSMODEL 在线软件, 以拟南芥 R2R3-MYB 蛋白 AtWER 为模板构建了 *LcMYB113* 蛋白 R2R3 结构域的三级结构, *LcMYB113* 蛋白与拟南芥 AtWER 蛋白的 R2R3 结构域氨基酸序列一致性达到 62.39%, 且 R2 和 R3 结构域各有 3 个 α 螺旋 (图 2 所示)。

将 *LcMYB113* 氨基酸序列在 NCBI 中进行 BlastP 搜索, 并进行同源氨基酸序列的多重比对及保守结构域分析, 如图 3 所示。*LcMYB113* 的 N 端含有典型的 R2R3 DNA 识别结构域, 其中 R3 结构域中还包含一个与 bHLH 结合识别的 [D/E]Lx₂[R/K]x₃Lx₆Lx₃R 基序。此外, 还发现了与花青苷合成调控相关的 ANDV 和 [K/R]P[Q/R]P[Q/R] 特征基序。

利用 Mega5 对包括 *LcMYB113* 在内的多种植物 MYB 氨基酸序列进行系统进化树构建, 结果如图 4 所示, 红花檵木 *LcMYB113* 与来源于木本植物的牡丹 (*Paeonia × suffruticosa*) PsMYB114 和 PsMYB58、葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 VvMYBA1 聚为一类, 且与草本植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* AtMYB113 和 AtMYB114、矮牵牛 (*Petunia × hybrida*) 的 PhAN2 等的亲缘关系较近, 它们同属于调控花青苷合成的 MYB 转录因子, 暗示这些 MYB 转录因子在花青苷的合成中可能具有相似的促进作用。



A. 红花檵木总 RNA (M. DL5000 marker); B. *LcMYB113* 基因扩增。

A. Total RNA of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* (M. DL5000 marker); B. Amplification of *LcMYB113* gene.

图 1 红花檵木总 RNA 及 *LcMYB113* 基因扩增

Fig. 1 Total RNA of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* and amplification of *LcMYB113* gene

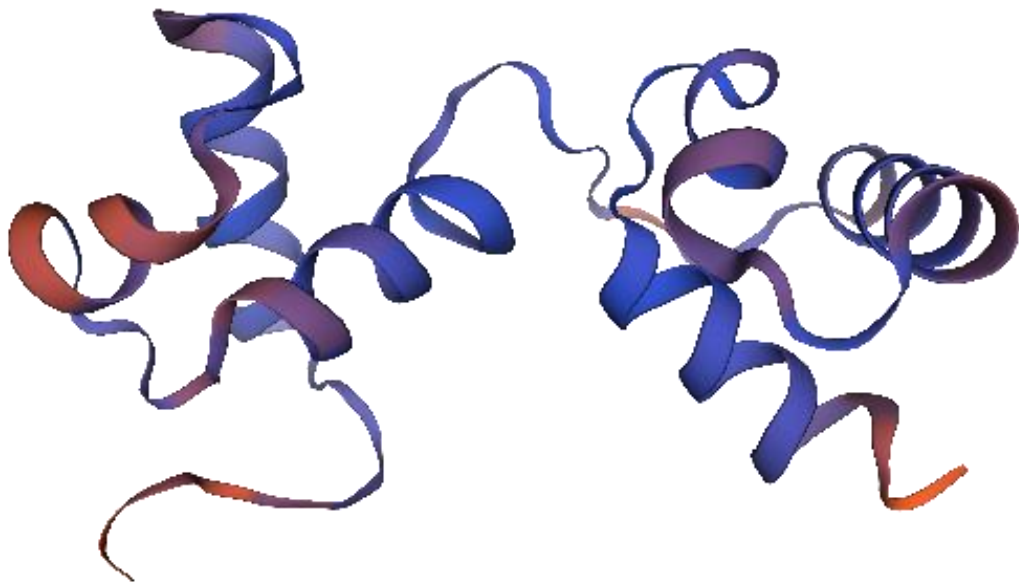


图2 LcMYB113 蛋白 R2R3 结构域的三级结构预测

Fig.2 Tertiary structure prediction of R2R3 domain in LcMYB113 protein

	R2	R3	
LcMYB113	MIRMYTNKNNVMSILGVRRKGSWIAEEELIRRCIVKMGEGNWWYFIIRAGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGDETIIDEVDIIRIRHKLIGNRWSLIAGR		101
AtMYB113MGESFKLRKGVWITTEELIRRCILKMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGKICSEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		91
LfMYB113MEAFGLVRKGVWITTEELIRRCIEEMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGDETIIDEVDIIRIRHKLIGNRWSLIAGR		90
CsMYB114-likeMEGVFLGVRRKGVWITTEELIRRCIEETNGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGSEGVDEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		91
PhAN4MKTISVFTSSGVLRKGSWITTEELIRRCIEKMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGDESEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		95
CsAN1MDIVCCVFLGVRRKGVWITTEELIRRCIEKMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGNETIDEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		94
PhAN2MSTSNASTSGVRKGVWITTEELIRRCIEKMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGDESEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		94
VvMybA1MESLGVRRKGVWITTEELIRRCIEKMGEGWHRVLFITGLNRCRKSCRIRWNYLFEIKRGDEFAIDEVDIVIRIRHKLIGNRWSLIAGR		89
	[D/E]LX ₂ [R/K]X ₃ LX ₆ LX ₃ R motif		
LcMYB113	LFGRANDVKNYWNTHICKKHVL...QTSKLENAQRTMIT...NVIRERKVSRLCPL.....MEKTSRVIKVQSAGGDIIRGMSPISSPSND		188
AtMYB113	LFGRANDVKNYWNTHISKKHDERCCKTKMINKNIISHTSSAQKILVIRERKESDPKNSCNLVN...ILEKVDVVLHIGINNVCESSTICNDE		187
LfMYB113	LFGRANDVKNYWNTHLYKKRMVSR...CEELKDSACKTVVKV...NVIRERKESKLEWLRENSSTMFEDIHQCKNSIISKPS.FQTAAALEVLD		184
CsMYB114-like	LFGRANDVKNYWNTHIQKKIIP...CIEVVVKVTPRMMET...KAIIRERKESKNLIWL...KSTTAIANIETRNNIFK...CLSPELSPFRD		175
PhAN4	LFGRANDVKNYWNTHILRRSKFAPFQCHRRCKFAIKTMARN...AIRERKESKNLIARNN...VSTIHKLEHSKCEIIEKPTTAEVVSRD		183
CsAN1	LFGRANDVKNYWNTHIQKKIIT...CREKVKAKTQEKMET...IIRERKESKNQFRL...MDKTAIENIETRENISEPF.FLELEFPSPRD		180
PhAN2	LFGRANDVKNYWNTHIRKKIIAPHL...CKCESKNKAMKITTEN...SIIRERKESFAMNHVSCWNGKSCNKNTILKNEGTEIIEKFGDEKQKPEESIV		190
VvMybA1	LFGRANDVKNYWNTHSHHFKKEVQ...FQEEGRKIEQTHSKT...KAIIRERKESKALRF...ELKTAVDTFITQVSTSS...KESSTSPCPN		172
	ANDV motif	[K/R]P[Q/R]P[Q/R] motif	
LcMYB113	AIFTWWEKLLVDDDERERCITCCINGLSHEN..VTNAEEITEATKGGDSLFEVEKNLCSGWSDEFTPENILWGFINA.....		262
AtMYB113	QRDKIININILIDGDNMWESILEADVLGPEATETARGVTIPIDFEQIWARFDEETLELN.....		246
LfMYB113	GNSQWETILLVDEDA.SCSISGSETPACN...VWSEIDIAEA.ANVGESFACG.CCSGWNEFFLVILCWILFQCEALI.		258
CsMYB114-like	DGISWENMFVDLEIN.KETILSIDGSNEEK...WHEKETCG.ILAIGDSSVQ.GESTIWNDFITKMDIWL.....		241
PhAN4	ENVEWNTNLLDNCNGFEKAATESAFAKNIESILNEELISFINGGTYFMCETRMGWSDLISIAL.IWELL.....		256
CsAN1	DGIS.WDNIVVNSKIN.NCITWSANGLIEFANIGNWDKIREGTHTSCGNFIDE.DCSLWSDIFFNNVNIWLLIGIE....		254
PhAN2	DGLQWVANLLANNIEIEELVSCNSPTLIHEET.....AFS.VNAESSITCG.GSGSLSDFSVITIDWLLVS.....		255
VvMybA1	DTIIWWEKLLAEHAFMQETTFASGLENLIAS...IRTEETAQKKGPMDCMIEICICGCEGDFEFTVG.FWITFNTQVNHL		249

LcMYB113. 红花檵木 (OR344758) ; **AtMYB113.** 拟南芥 (NP_176811.1) ; **LfMYB113.** 枫香树 (AQM49950.1) ; **CsMYB114-like.** 茶树 (XP_028068989.1) ; **PhAN4.** 矮牵牛 (ADQ00392.1) ; **CsAN1.** 茶树 (AOM63231.1) ; **PhAN2.** 矮牵牛 (BAP28593.1) ; **VvMybA1.** 葡萄 (ABD72954.1) 。

LcMYB113. *Loropetalum chinense* var. *rubrum* (OR344758) ; **AtMYB113.** *Arabidopsis thaliana* (NP_176811.1) ; **LfMYB113.** *Liquidambar formosana* (AQM49950.1) ; **CsMYB114-like.** *Camellia sinensis* (XP_028068989.1) ; **PhAN4.** *Petunia × hybrida* (ADQ00392.1) ; **CsAN1.** *Camellia sinensis* (AOM63231.1) ; **PhAN2.** *Petunia × hybrida* (BAP28593.1) ; **VvMybA1.** *Vitis vinifera* (ABD72954.1) 。

图3 氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of the amino acids

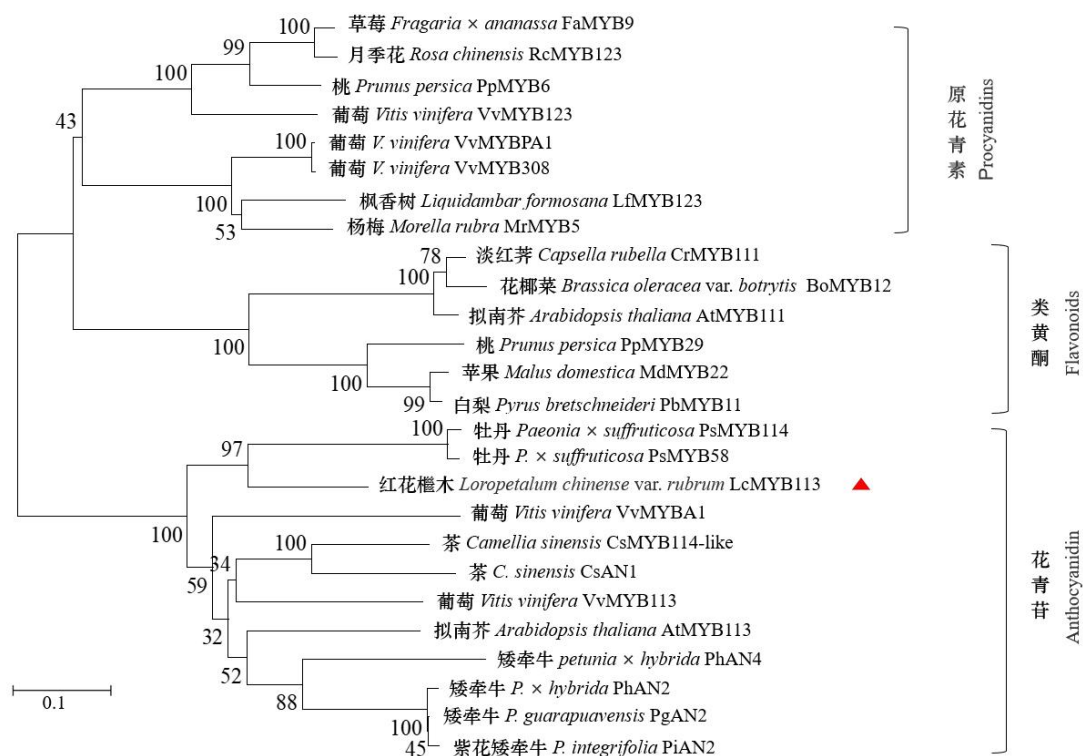
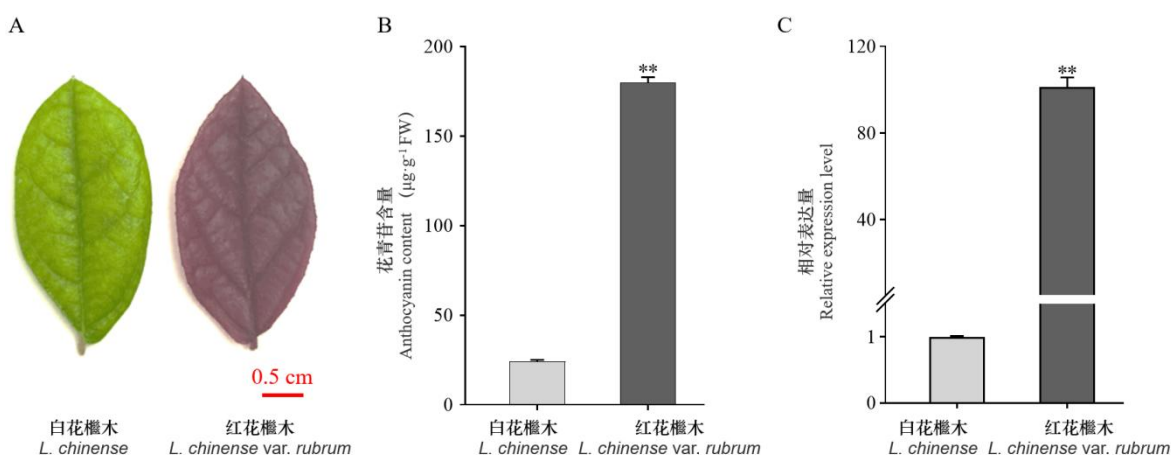


图4 LcMYB113 与其他植物 MYB 蛋白序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of LcMYB113 with MYB from other plants

2.2 红花檵木与白花檵木叶片花青苷含量及 LcMYB113 基因表达分析

红花檵木是白花檵木的变种，其叶片中都能够显著积累花青苷物质（图 5：A）。通过对红花檵木和白花檵木的叶片中花青苷物质进行提取分析，红花檵木的叶片中花青苷物质含量为 $(180 \pm 6) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ ，显著高于白花檵木叶片中的花青苷物质含量为 $(24 \pm 2) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ （图 5：B）。对红花檵木及白花檵木叶片中的 LcMYB113 基因的相对表达量进行检测，发现 LcMYB113 在红花檵木叶片中的相对表达量是白花檵木的 101 倍（图 5：C）。表明 LcMYB113 在红花檵木与白花檵木叶片中的表达趋势与其花青苷含量的趋势相一致。



A. 白花檵木与红花檵木叶片；B. 叶片花青苷含量；C. 叶片中 LcMYB113 相对表达量。** 表示差异显著 ($P < 0.01$)，下同。

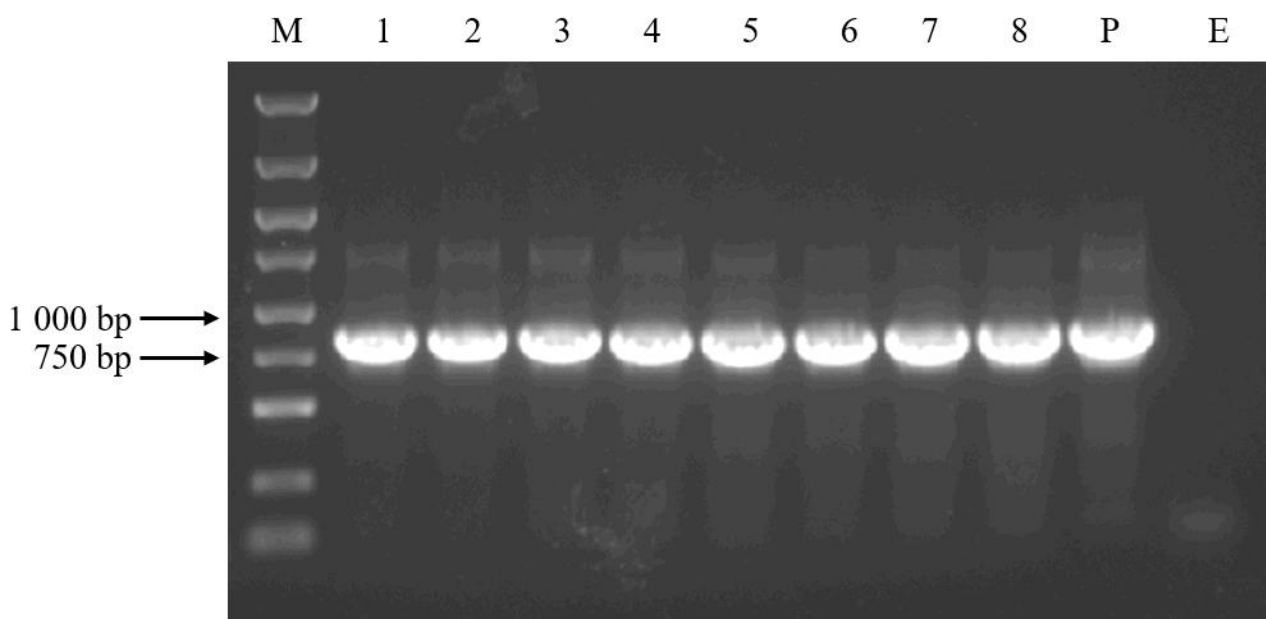
A. Leaves of *Loropetalum chinense* and *Loropetalum chinense* var. *rubrum*; B. Anthocyanin content in leaves; C. Relative expression levels of LcMYB113 in leaves. ** shows significant differences ($P < 0.01$), the same below.

图5 白花檵木和红花檵木叶片表型及 LcMYB113 表达

Fig. 5 Phenotype and LcMYB113 relative expression level in leaves of *Loropetalum chinense* and *L. chinense* var. *rubrum*

2.3 基因克隆及过表达载体构建

为深入探究 *LcMYB113* 基因的功能特性，本研究从红花檵木组织中提取总 RNA（图 1：A），再利用逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA。利用 *LcMYB113* 基因 ORF 序列的特异性引物，通过 PCR 技术成功克隆得到目的长度约为 800 bp 的 *LcMYB113* 基因片段（图 1：B）。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将 PCR 产物进行纯化与回收，并与线性化的 pSuper1300 过表达载体相连接，得到的重组载体转化大肠杆菌感受态 DH5 α 及测序正确。构建的重组载体转化至 EHA105 感受态菌株中，利用基因 ORF 扩增引物对单菌落进行 PCR 验证（图 6）。结果表明，所获得的 PCR 产物大小与预期长度一致，表明过表达载体的成功构建。



1-8. 8 个农杆菌菌落；M. DL5000 marker；P. 阳性对照；E. 空白对照。

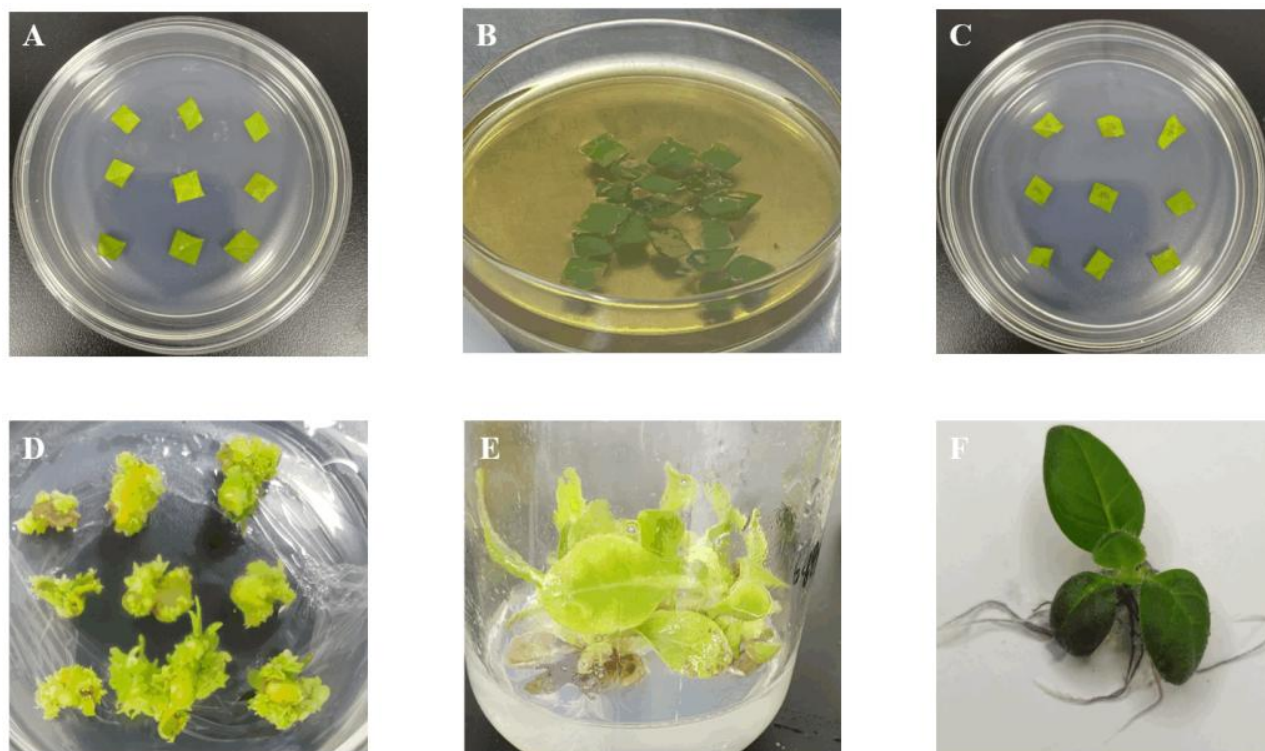
1-8. 8 individual *Agrobacterium tumefaciens* colonies；M. DL5000 marker；P. Positive control；E. Empty control.

图 6 *LcMYB113* 基因表达载体构建

Fig. 6 Expression vector construction of *LcMYB113*

2.4 遗传转化烟草与转基因株系表型分析

为了确定 *LcMYB113* 基因能够调控花青苷物质的合成，将 *LcMYB113* 基因构建到过表达载体上，并利用农杆菌介导的叶盘法，将 *LcMYB113* 基因转入烟草基因组中（图 7：A-F），对获得的转基因株系进行 PCR 扩增鉴定，表明潮霉素抗性基因 *HYG* 和 *LcMYB113* 基因均整合到 13 个 T0 代转基因株系的基因组中（图 8）。3 个代表性 T1 代转基因烟草株系的叶片（图 9：A）、花朵（图 9：C）等组织中均能够观察到花青苷物质的积累。半定量 RT-PCR 检测结果也表明，*LcMYB113* 基因的转录本在这 3 个 T1 代转基因株系中正常表达（图 9：B）。3 个代表性 T1 代转基因株系的叶片中花青苷含量分别为 (187 ± 16) 、 (309 ± 10) 和 (245 ± 35) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW，均远高于野生型烟草叶片花青苷的含量 (19 ± 2) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW（图 9：D）。进一步对不同 T1 代转基因株系叶片中花青苷生物合成结构基因的表达进行分析，3 个代表性转基因株系中包括 *NtANS*、*NtDFR*、*NtCHS*、*NtF3H*、*NtF3'H* 等多个花青苷生物合成结构基因的表达量显著升高（图 10）。其中 2 号转基因株系叶片中 *NtDFR*、*NtANS* 和 *NtF3'H* 的相对表达量为野生型株系的 200 倍以上，受到的诱导表达最为明显。上述结果表明 *LcMYB113* 能够促进烟草中花青苷生物合成结构基因的表达及花青苷物质的积累。

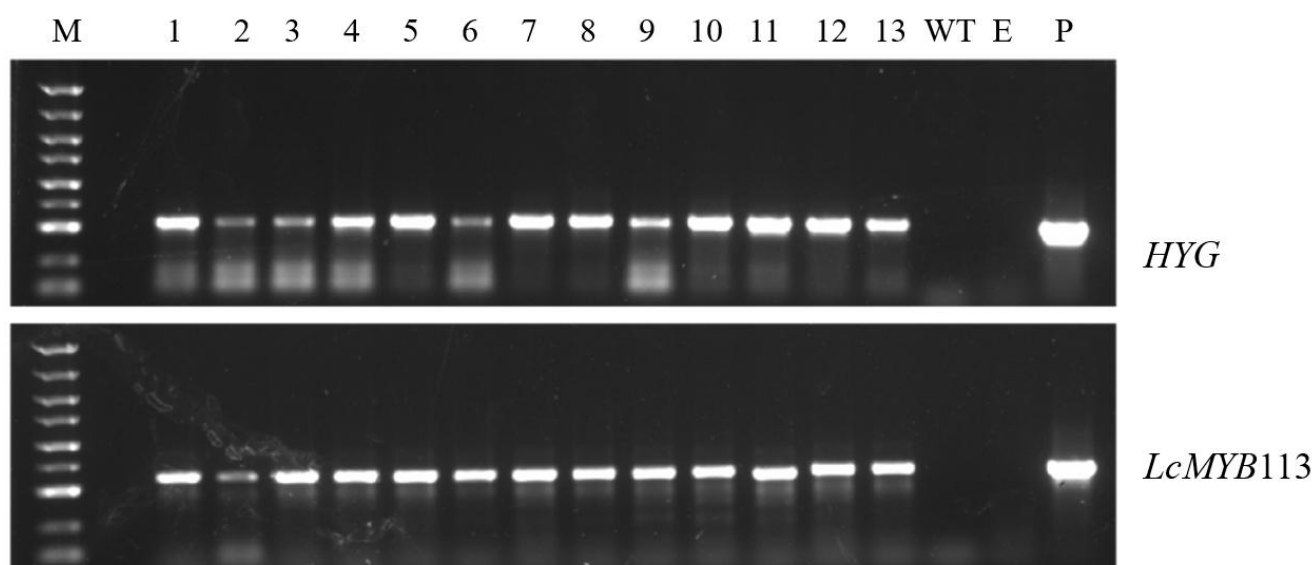


A. 预培养; B. 农杆菌侵染; C. 共培养; D. 诱导生芽; E. 诱导生根; F. 转基因植株。

A. Pre-cultivation; B. *Agrobacterium tumefaciens* infection; C. Co-cultivation; D. Shoot induction; E. Root induction; F. Transgenic plant.

图7 农杆菌介导的 *LcMYB113* 基因转化烟草

Fig. 7 *Agrobacterium*-mediated transformation of *LcMYB113* gene in tobacco

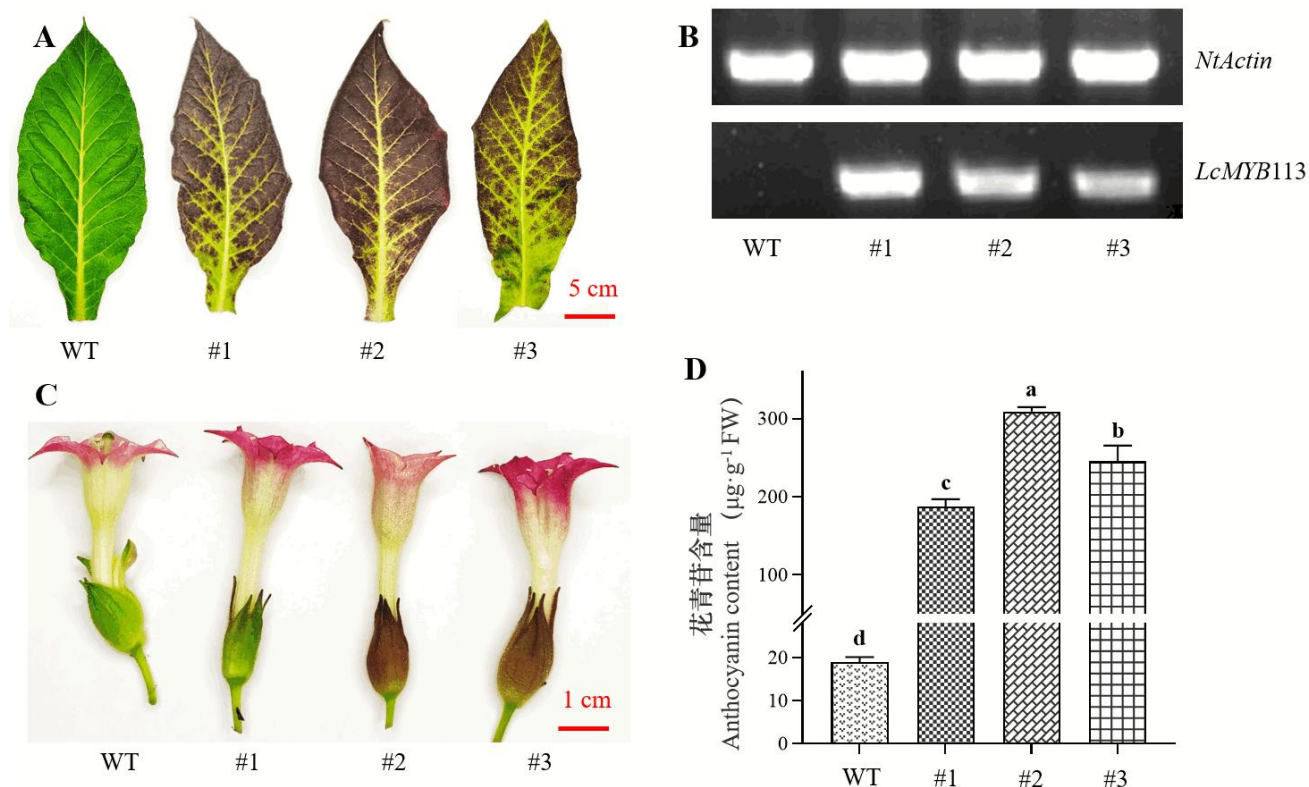


1-13. 不同的 T0 代转基因株系; M. DL5000 marker; WT. 野生型; E. 空白对照; P. 阳性对照。

1-13. Individual T0 transgenic lines; M. DL5000 marker; WT. Wide type; E. Empty control; P. Positive control .

图8 T0 代转基因植株 PCR 鉴定

Fig. 8 PCR identification of T0 generation plants



A. 野生型及T1代转基因植株叶片（#1、#2、#3代表性T1代转基因株系，下同）；B. 不同株系花朵；C. 不同株系叶片中*LcMYB113*基因表达；D. 不同株系叶片花青苷含量。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.01$)。

A. Leaves of wide type and T1 transgenic lines (#1, #2, #3. Different representative T1 transgenic lines; The same below); B. Flowers of different lines; C. *LcMYB113* expression in leaves of different lines; D. Anthocyanin content in leaves of different lines. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.01$).

图9 T1代转基因株系表型分析

Fig. 9 Phenotype analysis of T1 transgenic plants

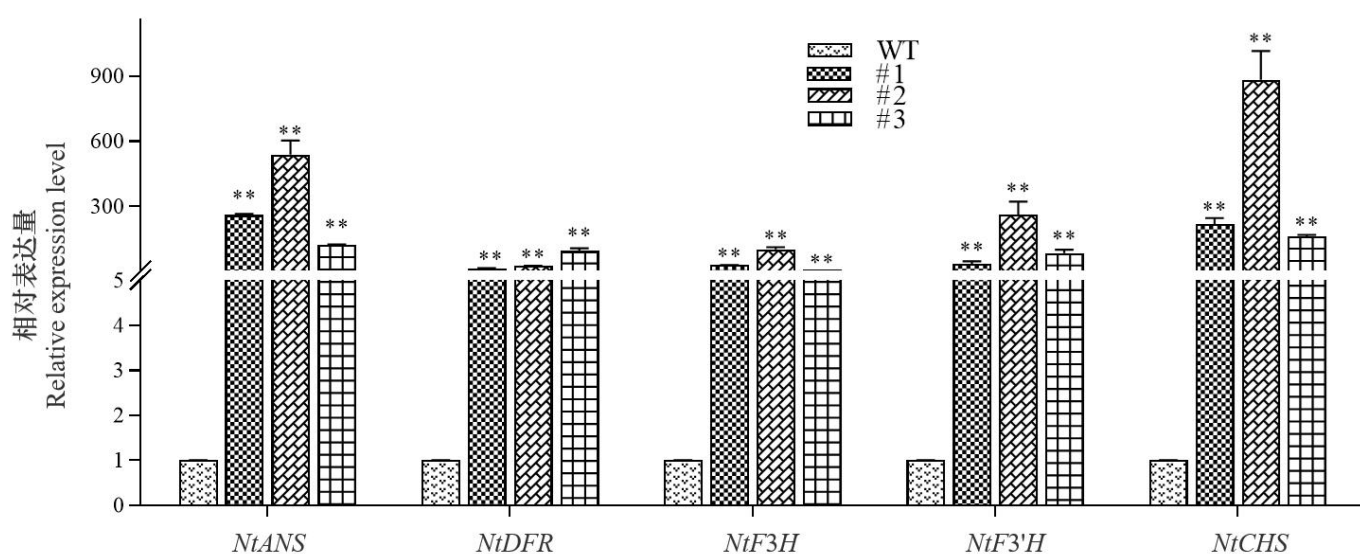


图10 转基因株系中花青苷生物合成结构基因表达分析

Fig. 10 Expression analysis of anthocyanin biosynthetic structural genes in transgenic plants

3 讨论与结论

本研究基于转录组测序结果,从红花檵木中分离得到了一个 *R2R3-MYB* 基因 *LcMYB113*,该基因编码 262 个氨基酸,*LcMYB113* 的 N 端具有保守的 R2R3 DNA 结合域,且三级结构预测表明其与拟南芥 *AtWER* 的 R2R3 结构域相似,均由两组各 3 个 α 螺旋构成,已经证实 *AtWER* 的 R2R3 结构域能够特异结合靶 DNA 序列 (Wang et al., 2020),推测 *LcMYB113* 的 R2R3 结构域也具备识别特异靶 DNA 序列的能力。在 *LcMYB113* 的 R3 结构域中有一个识别 bHLH 转录因子的 RB 基序,该基序保守地存在于很多 R2R3-MYB 家族蛋白的 R3 结构域中 (Zimmermann et al., 2004; Wu et al., 2022),推测 *LcMYB113* 能够利用 RB 基序与细胞内特定的 bHLH 因子结合形成调控复合物。在 *LcMYB113* 的 N 端 R3 结构域和 C 端调节结构域中还分别存在 1 个促进花青苷合成的 ANDV 和 [K/R]P[Q/R]P[Q/R]基序 (Yamagishi et al., 2010; Liu et al., 2022),这区别于抑制花青苷合成蛋白 *AtMYBL2* 的 TLLLFR 基序 (Matsui et al., 2008),也不同于抑制羟基肉桂酸合成蛋白 *AtMYB4* 的 EAR 基序 (Jin et al., 2000, Wu et al., 2022)。系统进化树分析也表明 *LcMYB113* 与其他植物调控花青苷合成调控 R2R3-MYB 分在同一亚组,例如牡丹的 *PsMYB58*、葡萄的 *VvMYBA1*、矮牵牛的 *PhAN2* 等,这与促进花青苷合成的 *PqMYB113* (Liu et al., 2022) 和 *RhMYB113c* (李茂福等, 2022) 的系统进化树分析结果相似。以上生物信息学分析结果支持 *LcMYB113* 基因编码促进花青苷合成的 R2R3-MYB 因子。

LcMYB113 基因在红花檵木叶片中的表达要显著地高于白花檵木中的表达,且与叶片中花青苷物质的含量高度相关,这种结果与其他正调控 R2R3-MYBs 基因的表达相似,例如菊花的 *CmMYB9a* (Wang et al., 2022b)、卵叶牡丹的 *PqMYB113* (Liu et al., 2022) 和月季的 *RhMYB113c* (李茂福等, 2022),推测红花檵木叶片中积累花青苷物质是由 *LcMYB113* 基因的高表达量引起的。在烟草中异源表达 *LcMYB113* 基因能够显著促进转基因植株叶片、花瓣及萼片等组织中花青苷的积累,同时也检测到花青苷合成结构基因表达量的提高,这与牡丹 *PsMYB58* (Zhang et al., 2021) 和卵叶牡丹 *PqMYB113* (Liu et al., 2022) 转基因烟草植株结果相似。菊花 *CmMYB9a* (Wang et al., 2022b) 和紫斑牡丹 *PrMYB5* (Shi et al., 2022) 在烟草异源表达仅影响花瓣色素的积累,而红掌 (*Anthurium andraeanum*) *AaMYB6* (李崇晖等, 2021) 在烟草中异源表达只促进花丝中色素的积累,这与 *LcMYB113* 转基因烟草的表型相差较大,说明不同的 R2R3-MYBs 基因在促进花青苷合成的能力上具有一定的差异性。以上结果表明,红花檵木 *LcMYB113* 基因具有较强的促进花青苷合成的能力。

综上所述,本研究克隆了红花檵木一个 R2R3-MYB 基因 *LcMYB113*,其编码氨基酸具有典型的 R2R3 DNA 结合域、bHLH 识别序列及花青苷调控特征基序,归类于正调控花青苷合成的 AN2 亚组。*LcMYB113* 基因的表达与红花檵木叶子中的花青苷物质积累正相关,在烟草中异源表达 *LcMYB113* 基因促进转基因植株中花青苷含量积累及花青苷合成结构基因的表达。因此,*LcMYB113* 是红花檵木中促进花青苷合成调控的转录因子。

致谢: 感谢中国农业大学朱元娣教授惠赠野生型烟草种子。

参考文献

- AN JP, WANG XF, ZHANG XW, et al., 2020. An apple MYB transcription factor regulates cold tolerance and anthocyanin accumulation and undergoes MIEL1-mediated degradation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 18(2): 337-353.
- CHAVES-SILVA S, SANTOS ALD, CHALFUN-JÚNIOR A, et al., 2018. Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants-tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables [J]. *Phytochemistry*, 153: 11-27.
- CHEN QR, CAI WQ, ZHANG X, et al., 2021. The comparative studies on phytochemicals of leaf coloration of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 48(10): 1969-1982. [陈倩如, 蔡文淇, 张霞, 等, 2021. 檵木不同叶色形成的化学成分比较研究 [J]. *园艺学报*, 48(10): 1969-1982.]

- DONG SL, MA JL, MO YH, et al., 2022. Review of research on germplasm resources and application of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. Guangxi Forestry Science, 51(2): 290-297. [董淑龙, 马姜明, 莫燕华, 等, 2022. 红花檵木种质资源与应用研究综述 [J]. 广西林业科学, 51(2): 290-297.]
- FELLER A, MACHEMER K, BRAUN EL, et al., 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. The Plant Journal, 66(1): 94-116.
- GALLOIS P, MARINHO P, 1995. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco [J]. Methods in Molecular Biology, 49: 39-48.
- JIN H, COMINELLI E, BAILEY P, et al., 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis [J]. The EMBO Journal, 19(22): 6150-6161.
- KHUSNUTDINOV E, SUKHAREVA A, PANFILOVA M, et al., 2021. Anthocyanin biosynthesis genes as model genes for genome editing in plants [J]. International Journal of Molecular Sciences, 22(16): 8752.
- LI CH, 2021. Cloning and genetic transformation of *LcCHSs* and *LcDFRs* genes from *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [D]. Zhuzhou: Hunan University of Technology: 31. [李彩虹, 2021. 红花檵木 *LcCHSs* 与 *LcDFRs* 基因的克隆及遗传转化 [D]. 株洲: 湖南工业大学: 31.]
- LI CH, YANG GS, ZHANG ZQ, et al., 2021. A novel R2R3-MYB transcription factor gene *AaMYB6* involved in anthocyanin biosynthesis in *Anthurium andraeanum* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 48(10):1859-1872. [李崇晖, 杨光穗, 张志群, 等, 2021. 红掌 R2R3-MYB 转录因子基因 *AaMYB6* 调控花青素苷合成 [J]. 园艺学报, 48(10): 1859-1872.]
- LI CJ, 2018. Study on the role of JEM in regulating jasmonate signaling-mediated anthocyanin biosynthesis [D]. Beijing: China Agricultural University: 48. [李长江, 2018. 拟南芥 JEM 调控 JA 信号诱导的花青素合成机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学: 48.]
- LI J, WU KL, LI L, et al., 2022. AcMYB1 interacts with AcbHLH1 to regulate anthocyanin biosynthesis in *Aglaonema commutatum* [J]. Frontiers in Plant Science, 13: 886313.
- LI MF, YANG Y, WANG H, et al., 2022. Analysis the function of R2R3 MYB transcription factor RhMYB113c on regulating anthocyanin synthesis in *Rosa hybrida* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 49(9): 1957-1966. [李茂福, 杨媛, 王华, 等, 2022. 月季中 R2R3-MYB 基因 *RhMYB113c* 调控花青素苷合成 [J]. 园艺学报, 49(9): 1957-1966.]
- LI ST, 2014. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex [J]. Plant Signaling & Behavior, 9(1): e27522.
- LIU X, DUAN J, HUO D, et al., 2022. The *Paeonia qiui* R2R3-MYB transcription factor PqMYB113 positively regulates anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* and tobacco [J]. Frontiers in Plant Science, 12: 810990.
- MATSUI K, UMEMURA Y, OHME-TAKAGI M, et al., 2008. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 55(6): 954-967.
- PENG RM, YU XY, 2012. Investigation and analysis of the landscape application present situation of *Loropetalum* in Hunan province [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 18(6): 152-155. [彭闰珉, 于晓英, 2012. 湖南檵木属植物的园林应用现状调查与分析 [J]. 天津农业科学, 18(6): 152-155.]
- REN YS, ZHANG SY, ZHAO QY, et al., 2023. The CsMYB123 and CsbHLH111 are involved in drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in *Chaenomeles speciosa* [J]. Molecular Horticulture, 3(1): 25.
- RONG DY, ZHANG X, PAN T, et al., 2019. Cloning, expression and transformation of *LcFLS1* gene from *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 39(3): 404-412. [荣朵艳, 张翔, 潘婷, 等, 2019. 红花檵木 *LcFLS1* 基因的克隆及其表达与转化研究 [J]. 西北植物学报, 39(3): 404-412.]

- SHI QQ, YUAN M, WANG S, et al., 2022. *PrMYB5* activates anthocyanin biosynthetic *PrDFR* to promote the distinct pigmentation pattern in the petal of *Paeonia rockii* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 13: 955590.
- SUN SJ, ZHANG Q, YU YF, et al., 2022. Leaf coloration in *Acer palmatum* is associated with a positive regulator *ApMYB1* with potential for breeding color-leafed plants [J]. *Plants*, 11(6): 759.
- WANG BH, LUO Q, LI YP, et al., 2020. Structural insights into target DNA recognition by R2R3-MYB transcription factors [J]. *Nucleic Acids Research*, 48(1): 460-471.
- WANG BH, LUO Q, LI YP, et al., 2022a. Structural insights into partner selection for MYB and bHLH transcription factor complexes [J]. *Nature Plants*, 8(9): 1108-1117.
- WANG YG, ZHOU LJ, WANG YX, et al., 2022b. CmMYB9a activates floral coloration by positively regulating anthocyanin biosynthesis in chrysanthemum [J]. *Plant Molecular Biology*, 108: 51-63.
- WU Y, WEN J, XIA YP, et al., 2022. Evolution and functional diversification of R2R3-MYB transcription factors in plants [J]. *Horticulture Research*, 9: uhac058.
- YAMAGISHI M, SHIMOYAMADA Y, NAKATSUKA T, et al., 2010. Two *R2R3-MYB* genes, homologs of *Petunia AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily [J]. *Plant and Cell Physiology*, 51(3): 463-474.
- YAN HL, PEI XN, ZHANG H, et al., 2021. MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6): 3103.
- YIN XJ, ZHANG YB, ZHANG L, et al., 2021. Regulation of MYB transcription factors of anthocyanin synthesis in lily flowers [J]. *Frontiers in Plant Science*, 12: 761668.
- ZHANG L, YU XY, FU HY, et al., 2013. Reference genes selection for real-time fluorescence quantitative PCR in *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 29(10): 11-17. [张力, 于晓英, 符红艳, 等, 2013. 红花檵木实时荧光定量 PCR 分析内参基因的选择 [J]. *中国农学通报*, 29(10): 11-17.]
- ZHANG X, 2020. Cloning, expression and transformation of *LcCHI* and *LcANS* genes from *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [D]. Zhuzhou: Hunan University of Technology: 32. [张翔, 2020. 红花檵木 *LcCHI*、*LcANS* 基因的克隆、表达分析及转化的研究 [D]. 株洲: 湖南工业大学: 32.]
- ZHANG X, ZHANG L, ZHANG DM, et al., 2023. Comprehensive analysis of metabolome and transcriptome reveals the mechanism of color formation in different leave of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *BMC Plant Biology*, 23(1): 133.
- ZHANG YF, WANG H, HUO WW, et al., 2022. Analysis of seasonal mosaic leaf phenotype and photosynthetic physiological response of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 31(12): 1579-1588. [张艺帆, 王慧, 霍雯雯, 等, 2022. 红花檵木季节性花叶表型及其光合生理响应分析 [J]. *西北农业学报*, 31(12): 1579-1588.]
- ZHANG YZ, XU SZ, MA HP, et al., 2021. The R2R3-MYB gene *PsMYB58* positively regulates anthocyanin biosynthesis in tree peony flowers [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 164: 279-288.
- ZIMMERMANN IM, HEIM MA, WEISSHAAR B, et al., 2004. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins [J]. *The Plant Journal*, 40(1): 22-34.